

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

Untersuchungen zum Nachweis
verschiedener Handelsformen
von Benzodiazepinderivaten im Urin

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von
Detlef Queckenstedt
aus
Hochweitzschen

Marburg 1973

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

Untersuchungen zum Nachweis
verschiedener Handelsformen
von Benzodiazepinderivaten im Urin

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von
Detlef Queckenstedt
aus
Hochweitzschen

Marburg 1973



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 18. 9. 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. Oepen

Referent: Prof. Dr. Schleyer

Correferent: Prof. Dr. Koransky

*Meinen Eltern
in Dankbarkeit*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553805_0117

A. <u>Einleitung</u>	1
I. Wirkungsweise der Benzodiazepine	1
II. Biotransformation der Benzodiazepine	2
III. Die untersuchten Handelspräparate.	10
IV. Themenstellung.	11
B. <u>Eigene Untersuchungen</u>	13
I. Urinaufarbeitungen	13
1. Ohne Hydrolyse oder Spaltung der Glukuronide mit β -Glukuronidase	13
2. durch Hydrolyse in 1n HCl	14
3. Spaltung der Glukuronide mit β -Glukuronidase. 14	
II. Dünnschichtchromatografie	14
1. Herstellung der Dünnschichtplatten	15
2. Auftragen der Substanzen	15
3. Fließmittel.	16
a) Benzol	16
b) Chloroform:n-Heptan:Äthanol:10:10:1	16
4. Anfärben der Substanzflecke.	16
a) Optisches Verhalten unter sichtbarem und UV-Licht.	16
b) Sprühreagentien	21
5. Entwickeln der Substanzflecke.	22
III. Empfohlene Analysenmethodik.	27
C. <u>Zusammenfassung</u>	28
D. <u>Literatur</u>	29

I. Wirkungsweise der Benzodiazepine

Untereinander zeigen verschiedene Benzodiazepine zum Teil erhebliche Unterschiede in Wirkung und Toxizität. So hat das 7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxyd (Chlordiazepoxyd), im Handel als LIBRIUM, LIBRAX und LIMBATRIL, eine ausgesprochen angstlösende und tranquillierende Wirkung. Das 7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (Diazepam), im Handel als Valium, hat ein ähnliches Wirkungsspektrum, aber der sedativ-schlaffördernde Effekt ist stärker ausgeprägt (KAMM und BEIER).

Sowohl das 7-Chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin (Medazepam), im Handel als NOBRIUM, wie auch das 7-Chlor-3-carboxy-1,3-dihydro-2,2-dihydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin (Dikalium-Chlorazepat), im Handel als TRANXILLIUM, haben so gut wie keine sedativ-hypnotische Wirkung (BRUNAUD et al.), dagegen kommt die angstlösende Wirkung von Dikalium-Chlorazepat der des Diazepams gleich (HOFMAN et al.)

7-Chlor-5-(o-chlorphenyl)-1,3-dihydro-3-hydroxy-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (Lorazepam), im Handel als TAVOR, liegt in seiner muskelrelaxierenden Wirkung zwischen Diazepam und Chlordiazepoxyd (GLUCKMANN), ist jedoch 2-4mal stärker angstlösend als Diazepam (STEIN und BERGER).

Einen ausgesprochen sedativ-hypnotischen Effekt hat das 1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (Nitrazepam), im Handel als MOGADAN, das in sei-

nen sonstigen Eigenschaften denen des Diazepams und des Chlordiazepoxyds ähnelt (BRUNAUD et al.)

II. Biotransformation der Benzodiazepine

Die einzelnen Benzodiazepine unterscheiden sich aber nicht nur in ihrer pharmakologischen Wirkung, sondern auch in ihrem Abbau im Organismus und den renalen Ausscheidungsprodukten. Im Folgenden werden kurz die wesentlichen Stufen des Stoffwechsels der einzelnen Derivate nach Angaben der Literatur beschrieben.

Chlordiazepoxyd

Bei der Ausscheidung über den Urin - die Eliminierung über die Faeces spielt beim Menschen praktisch keine Rolle - liegt nur ein kleiner Teil des Medikamentes in der Originalform als Glukuronid vor.

Zunächst wird die Substanz an der Aminogruppe demethyliert (SCHWARZ und POSTMA), dann oxidativ zum zyklischen Laktam desaminiert. Aus dem Laktam bildet sich unter Ringöffnung das offene Laktam (KOECHLIN et al.). Im Harn selbst wird Chlordiazepoxyd allmählich in das 2-Amino-5-chlorbenzophenon umgewandelt (PRIBILLA). Hat der Urin längere Zeit gestanden, so ist damit zu rechnen, daß

sich die Intermediärprodukte in 2-Amino-5-chlorbenzophe-
non umgewandelt haben.

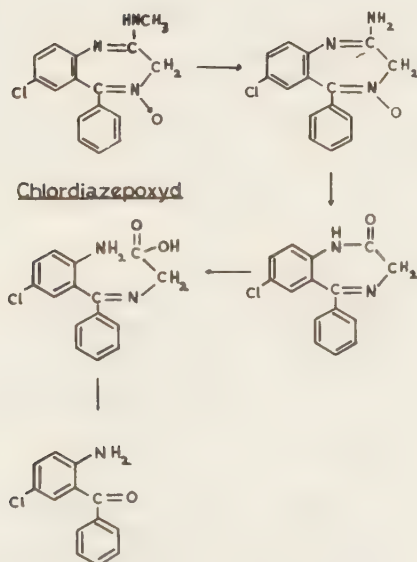


Abb. 1 Abbaueg von Chlordiazepoxyd

Diazepam

Auch hier wird als erster Metabolisierungsschritt die Methylgruppe am Stickstoff abgespalten (DE SILVA et al., JOMMI et al.). Nach einer anschließenden Hydroxylierung am C₃ (SCHWARTZ et al.) entsteht Oxazepam, das zum größten Teil als Glukuronid im Harn gebunden vorliegt. Ursprüngliches Diazepam konnte von RUELIUS et al. im Urin nicht mehr nachgewiesen werden.

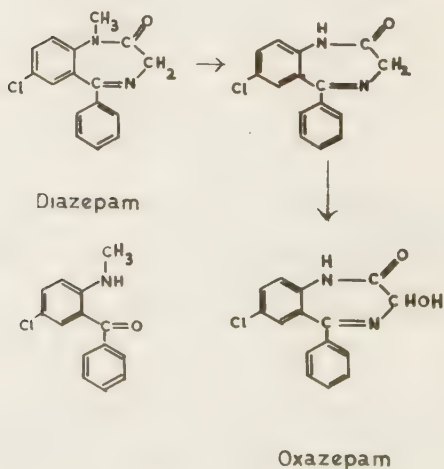
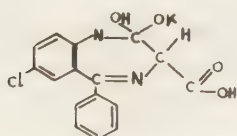


Abb. 2 Abbauweg von Diazepam

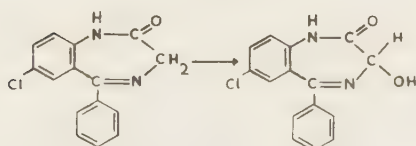
Ein Teil des Diazepams wird, analog dem 2-Amino-5-chlorbenzophenon, direkt zum 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon abgebaut.

Dikalium-Chlorazepat

Der größte Teil dieses Benzodiazepin-Derivates wird schon im Magen-Darm-Trakt zu Desmethyldiazepam reduziert. In dieser Form wird es resorbiert und weiter zu Oxazepam hydroxyliert (BEYER). Im Urin wird der Hauptanteil als glukuroniertes Oxazepam eliminiert.



Dikalium-Chlorazepat



Desmethyldiazepam

Oxazepam

Medazepam

Die Biotransformation dieser Substanz wurde von RIEDER und RENTSCH umfassend aufgeklärt. Das Schema, das sie auf Grund ihrer Untersuchungen aufstellten, ist unten abgebildet. Danach wandelt sich Medazepam in Diazepam (V) und weiter in Oxazepam (X) um. Dabei waren die Hauptausscheidungsprodukte des Medazepams der Metabolit II und das konjugierte Oxazepam.

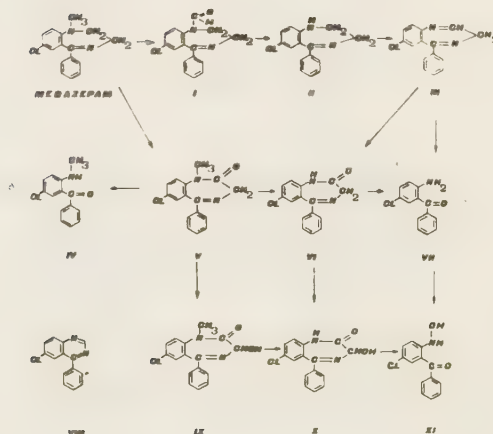


Abb. 4 Abbauweg von Medazepam

Nitrazepam

Von RIEDER wurde der 7-Amino-Metabolit und der 7-Acetamino-Metabolit isoliert. PRIBILLA fand nach Hydrolyse das 2-Amino-5-nitrobenzophenon und außerdem 5 weitere Metaboliten im Harn, die er aber nicht näher beschrieb. BEYER und SADEE fanden zusätzlich zu den bereits erwähnten Abbauprodukten noch einen 7-Amino-3-hydroxy-Metaboliten. Das ursprüngliche Medikament war nur in extrem niedriger Konzentration im Urin enthalten.

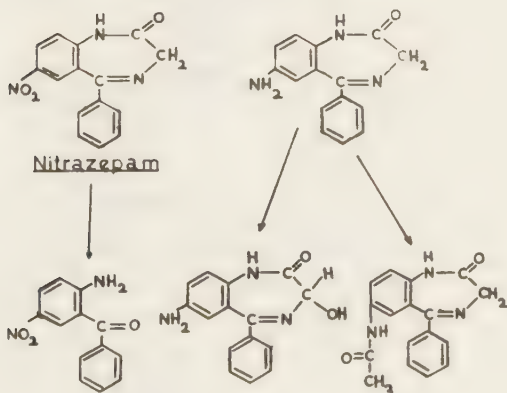


Abb. 5 Abbauweg von Nitrazepam

Oxazepam

Hauptausscheidungsprodukt dieses Pharmakons im menschlichen Urin ist das Oxazepam-Glukuronid (99%). Daneben fanden SISENwine et al. noch 6 weitere Metaboliten (s. unteres Schema), die aber alle zusammen nur 1% des ausgeschiedenen Medikamentes ausmachten.

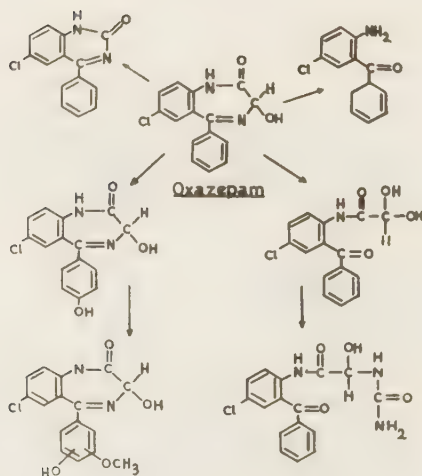


Abb. 6 Abbaueg von Oxazepam

Lorazepam

Ähnlich wie das Oxazepam ist auch das Lorazepam durch seine Hydroxylgruppe für eine schnelle Glukuronierung begünstigt. Sein Hauptausscheidungsprodukt ist deshalb auch das Lorazepam-Glukuronid. Die anderen Metaboliten machen, wie beim Oxazepam, nur eine verschwindend geringe Menge aus (KNOWLES et al.). SCHILLINGS et al. fanden außerdem beim Menschen 2 Metaboliten, nämlich ein Hydroxy-Derivat des Lorazepams und das 6-Chlor-4-(o-chlor-phenyl)-2(1H)-chinazolinon. Bei Hydrolyse entstand das 2-Amino-2,5-dichlorbenzophenon.

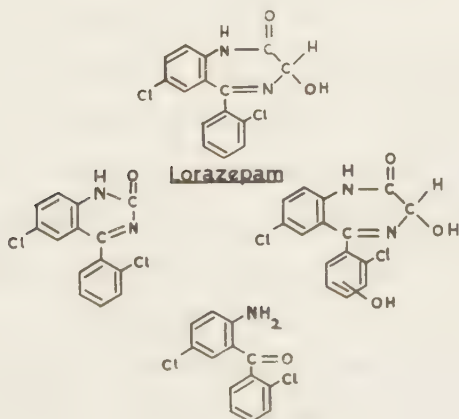


Abb. 7 Abbaueg von Lorazepam

III. Die untersuchten Handelspräparate

Die Benzodiazepine sind - was besonders für den Laien sehr wichtig ist - auch in ihrer Konfektionierung sehr unterschiedlich. Sie sind als Tabletten, Dragees und Kapseln im Handel. Diese sind zur besseren Unterscheidung fast immer gefärbt.

Es wurden folgende Handelspräparate untersucht:

Handelsname	Benzodiazepin- derivat	Konfektionierung	
		Form	Farbe
Librium 5	Chlordiazepoxyd	Dragee	hellgrün
" 10	"	Kapsel	grün-schwarz
" 25	"	Dragee	grün
" Tabs.	"	Tabl.	"
Librax ⁺	"	Dragee	"
Limbatri ⁺	"	Kapsel	grün-orange
Valium 2	Diazepam	Tabl.	weiß
" 5	"	"	gelb
" 10	"	"	hellblau
Tranxillium 5	Dikaliumchlor-	Kapsel	rosa-weiß
" 10	azepat	"	rosa
Nobrium 5	Medazepam	"	orange-weiß
" 10	"	"	orange-schwarz
Mogadan	Nitrazepam	Tabl.	weiß
Adumbran	Oxazepam	"	"

Handelsname	Benzodiazepin- derivat	Konfektionierung	
		Form	Farbe
Praxiten	Oxazepam	Tabl.	weiß
Tavor 1	Lorazepam	"	"
" 2,5	"	"	"

⁺In den Handelspräparaten LIBRAX und LIMBATRIL ist außer dem Chlordiazepoxyd noch 5-(3'-Dimethylamino-propyliden)-dibenzo [a, d] [1,4] cycloheptadien - der Wirkstoff des LAROXYL - enthalten.

IV Themastellung

Der unkontrollierte Gebrauch von Benzodiazepinderivaten nimmt immer mehr zu. Dem untersuchenden Arzt stellt sich häufig die Frage, ob der Patient neben den verordneten Medikamenten noch ein oder manchmal sogar mehrere Benzodiazepin-Präparate zu sich nimmt, und um welche Präparate es sich dabei handelt.

Einige der Patienten sind nicht in der Lage (z.B. komatöser Zustand) oder nicht bereit, wahre Angaben über ihren Tablettenkonsum zu machen. Für den behandelnden Arzt ist daher die chemisch-toxikologische Untersuchung die einzige Möglichkeit, genau Angaben über einen vermu-

teten Medikamenten-Abusus zu erhalten. Die häufige Bitte, Urinproben von Patienten auf Benzodiazepin-Körper hin zu analysieren, war Anlaß für die vorliegende Untersuchung.

Es galt also, ein Untersuchungsverfahren zu entwickeln, das es erlaubt, durch chemische Analyse von Harnproben Rückschlüsse über die Einnahme einzelner Benzodiazepin-Derivate zu ziehen. Für eine Zuordnung an Hand der im Urin gefundenen Metaboliten und der Begleitstoffe, die von der Tabletten- oder Drageefertigung stammen, bieten sich mehrere Wege an.

Bei Routineuntersuchungen aus dem Material des Institutes hatte sich bei dem Verfahren nach KAMM und BEYER (kurze saure Hydrolyse in der Wärme und Dünnschichtchromatografie des basischen Extraktes) häufig neben den bekannten 2 Hauptmetaboliten 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon und 2-Amino-5-chlorbenzophenon eine Reihe von gegeneinander gut abgegrenzten farbigen Substanzflecken gezeigt. Diese Farbstoffe können entweder nur aus der Nahrung (Lebensmittelfarbstoffe) oder aus Zusätzen bei der Dragee- bzw. Tablettenfertigung stammen.

B. Eigene Untersuchungen

I. Urin-Aufarbeitung

Die Versuchspersonen waren gesunde männliche Freiwillige, die abends gegen 19 Uhr zunächst Leerurin ließen. Danach nahmen sie 30 mg des zu untersuchenden Benzodiazepin-Derivates ein und ließen am nächsten Morgen gegen 7 Uhr erneut nüchtern Urin. In weiteren Versuchsreihen wurde bei denjenigen Präparaten, die in Kapselform vorlagen (s. S. 9 und S.10), Wirksubstanz und Kapsel voneinander getrennt und auch kombiniert eingenommen.

Der bei der Aufarbeitung nicht sofort benötigte Harn wurde tiefgefroren asserviert. Dieses Sammeln des Urins und seine Aufbewahrung blieb bei sämtlichen Versuchen gleich.

1. Aufarbeitung ohne Hydrolyse oder Spaltung der Glukuronide mit β -Glukuronidase

20 ml des Urins wurden mit NaOH auf einen pH von 8.5 eingestellt. Dreimal wurde die Urinprobe danach mit je 40 ml peroxidfreiem Diäthyläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge wurden mit geglühtem Natriumsulfat entwässert und auf dem Wasserbad durch Destillation von Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in maximal 5 Tropfen Benzol aufgenommen.

2. Aufarbeitung durch Hydrolyse in 1n HCl

20 ml Probandenurin wurden in einen 50 ml-Kolben gegeben und 2,5 ml konz. HCl zugesetzt, so daß eine Gesamtnormalität von 1n HCl erreicht wurde. Das Gemisch wurde dann unter Rückfluß 30 min bei 100°C hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurde das Reaktionsgemisch in Eiswasser abgekühlt und mit 10n NaOH auf pH 10 gebracht. Darauf wurde, wie oben beschrieben, mit Äther extrahiert. Zur Kontrolle wurde eine Parallelprobe mit Chloroform an Stelle von Äther extrahiert. Das nach der Entwicklung erhaltene Fleckenbild zeigte keine Unterschiede von Äther- oder Chloroformextrakt.

3. Spaltung der Glukuronide mit β -Glukuronidase

100 ml Urin wurden mit Azetatpuffern auf einen pH von 4,8 eingestellt. Nachdem diesen Urinproben dann 0,25 ml β -Glukuronidase = 25.000 Fischmann-Einheiten zugesetzt worden war, wurden sie im Wärmeschrank 15 Stunden bei 37°C inkubiert. 25 ml dieser Proben wurden nach Alkalisieren, wie oben beschrieben, mit Diäthyläther extrahiert.

II. Dünnschichtchromatografie

Zur Trennung von Substanzgemischen im Hammbereich (- Bereich) läßt sich die Dünnschichtchromatografie (DC) wegen ihrer leichten Handhabung, dem relativ ge-

ringen Geräteaufwand und ihrer guten Überschaubarkeit sowie Reproduzierbarkeit mit Erfolg anwenden.

1. Herstellung der Dünnschichtplatten

Glasplatten vom Format 20 x 20 cm wurden mit Hilfe eines Streichgerätes (DESAGA) mit Kieselgel-G MERCK beschichtet. Dazu wurden 30 g Kieselgel mit 65 ml Aqua bidest. angerührt und die glattgerührte Masse in das Streichgerät eingefüllt, nachdem dieses auf eine Streichdicke von 0.25 mm eingestellt worden war. In einem Zug wurde dann das Kieselgel-Wasser-Gemisch gleichmäßig aufgetragen. Die Platten wurden an der Luft getrocknet. Dann wurde in Laufrichtung an beiden Seiten ein etwa 0.5 cm breiter Streifen des Kieselgels entfernt, um das Randphänomen bei der anschließenden Chromatografie auszuschalten und die Streichrichtung zu markieren. Vor dem Auftragen der Extrakte wurden die Kieselgelplatten 15 min. bei 110 C im Trockenschrank aktiviert.

2. Auftragen der Substanzen

Die Startlinie wurde 2.5 cm vom unteren Rand der Platte entfernt gewählt. Der Abstand der Startpunkte untereinander differierte, je nachdem, wie viele Proben aufgetragen werden sollten, war aber nie geringer als 3 cm. Die Laufstrecke betrug bei allen Versuchen genau 17.5 cm. Beim

Auftropfen der Urinextrakte und der Leitsubstanzen wurde darauf geachtet, daß die Startflecke nicht größer als 0.5 cm im Durchmesser wurden.

3. Fließmittel

a) Benzol

Die so vorbereiteten DC-Platten kamen zum Konditionieren 30 min in die Trennkammer, die das Fließmittel enthielt, ohne daß sie in das Fließmittel eintauchten. Danach wurden sie in das Fließmittel eingetaucht und nach Erreichen der vorgeschriebenen Laufhöhe von 17.5 cm aus der Kammer zum Trocknen entnommen. Das Fließmittel Benzol ergab zwar gut abgesetzte Substanzflecke, jedoch lagen Störsubstanzen aus dem Urin dicht bei den Benzodiazepin-Spaltprodukten 2-Amino- und 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon.

b) Chloroform: n-Heptan: Äthanol = 10:10:1

Eine wesentlich bessere Auftrennung konnte mit diesem Fließmittel erzielt werden, weil die Störsubstanzen in der Nähe der Startflecke zurückgehalten wurden. Deshalb wurde es in allen weiteren Versuchsreihen verwendet.

4. Anfärben der Substanzflecke

a) Optisches Verhalten unter sichtbarem und UV-Licht

Die entwickelten und getrockneten DC-Platten zeigten sowohl im sichtbaren Licht, als auch im gefilterten

UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm zahlreiche Substanzflecke.

Die Auswertung des Fleckenbildes der Versuchsreihen mit wirkstofffreien Kapseln im Vergleich zu den Leerurinen ergab das völlige Fehlen der Kapselfarbstoffe im Ätherextrakt. Die beobachteten, zum Teil lebhaft gefärbten Substanzflecke mußten daher aus der aufgenommenen Nahrung (Lebensmittelfarbstoffe?) stammen. Versuche, die Kapselfarbstoffe im Urin vor der salzsauren Hydrolyse oder vor der Glukuronidabspaltung mit β -Glukuronidase zu fassen, schlugen ebenfalls fehl. Im Folgenden werden deshalb nur die Flecke erwähnt, die von Benzodiazepinkörpern oder deren Metaboliten stammen.

Bei den Urinextraktionen ohne Hydrolyse oder Glukuronidabspaltung mit β -Glukuronidase fand sich nur sehr wenig von dem ursprünglichen Wirkstoff. Ähnliches gilt für die Metaboliten. Dafür traten die oben erwähnten Farbstoffe aus der Nahrung stärker hervor.

Bei den Aufarbeitungen mit Hydrolyse oder mit Glukuronidabspaltung war das Fleckenbild im Wesentlichen gleich. Bei der chemisch sehr milden Arbeitsweise der fermentativen Spaltung der Glukuronidbindung werden nur wenige farbige Störsubstanzen gebildet und extrahiert. Sie treten deshalb im dünn-schicht-chromatografischen Substanzfleckenbild viel weniger in Erscheinung und lassen es klarer erscheinen.

Die den Benzodiazepin-Derivaten oder den hydrolysepro-

dukten 2-Amino- und 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon entsprechenden Flecke haben eine zitronengelbe Farbe. Bis auf das Medazepam zeigen sämtliche Präparate nach salzsaurer Hydrolyse oder Behandlung mit β -Glukuronidase nur einen deutlichen gelben Fleck. Da Medazepam sich bei seinem Abbau unter anderem auch in Diazepam umwandelt, findet sich bei $R_f = 0.69$ sowie $R_f = 0.50$ je ein gelber Fleck.

Das Hydrolyseprodukt des Lorazepams, das 2-Amino-2.5-dichlorbenzophenon, zeigt dünn-schichtchromatografisch keinen Unterschied zum 2-Amino-5-chlorbenzophenon. Im Gegensatz dazu hat das Hydrolyseprodukt des Nitrazepams, das 2-Amino-5-nitrobenzophenon, in dem Fließmittelgemisch Chloroform:n-Heptan:Äthanol = 10:10:1, das bei diesen Versuchen verwendet wurde, nur einen $R_f = 0.35$. Die Befunde sind in der Abb. 1 zusammengefaßt.

Wird die gleiche Platte unter UV-Licht betrachtet, so finden sich auch hier fluoreszierende Flecke, die aus der Nahrung stammen können und nicht mit Benzodiazepin-metaboliten verwechselt werden dürfen. Eine Unterscheidung kann aber leicht getroffen werden, da die Spontana-fluoreszenz von 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon sich erst bei mehrstündigem Liegen der DC-Platte an der Luft ausbildet.

Von den untersuchten Präparaten zeigen nur Diazepam und Medazepam einen fluoreszierenden Fleck und zwar bei $R_f = 0.69$ (Abb.2)

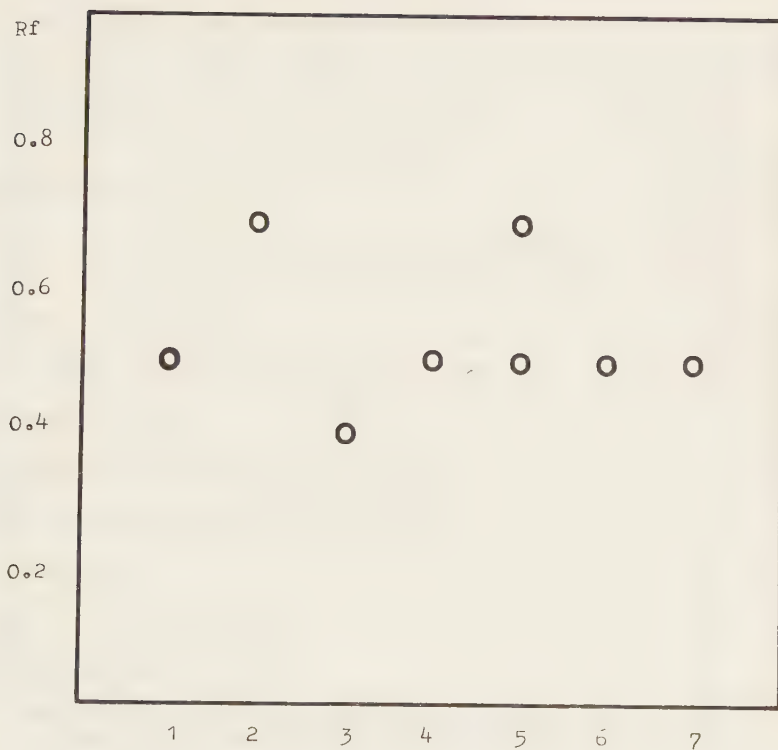


Abb. 8 Verhalten unter sichtbarem Licht

- 1 = Chlordiazepoxyd
- 2 = Diazepam
- 3 = Nitrazepam
- 4 = Dikaliumchlorazepat
- 5 = Medazepam
- 6 = Oxazepam
- 7 = Lorazepam

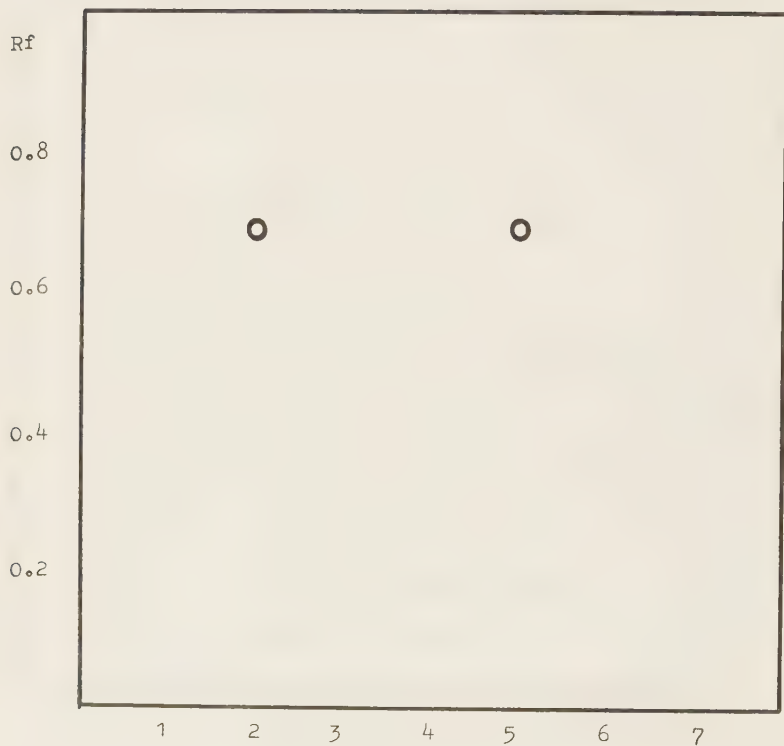


Abb. 9 Verhalten unter UV - Licht

- 1 = Chlordiazepoxyd
- 2 = Diazepam
- 3 = Nitrazepam
- 4 = Dikaliumchlorazepat
- 5 = Medazepam
- 6 = Oxazepam
- 7 = Lorazepam

b) Sprühareagentien

Zum Entwickeln der Substanzflecke wurden folgende
Sprühreagentien verwendet:

Sprühareagens I:

20 mg N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid
(MERCK) Nr. 6237)

20 ml n-Butanol (MERCK Nr. 1990)

1 ml 2n Salzsäure

(kühl aufbewahrt längere Zeit haltbar; wenn die
farblose Sprühlösung sich blau färbt, muß sie ver-
worfen werden.)

Sprühareagens II:

10 ml 15% Titan (III)-chlorid-Lösung (MERCK Nr. 8307)

90 ml 1n Salzsäure

(frisch vor Gebrauch ansetzen, nicht haltbar).

Sprühareagens III:

1 g 2.4-Dinitrophenylhydrazin (MERCK Nr. 3080)

1000 ml Athanol (MERCK Nr. 972)

10 ml konz. Salzsäure

Sprühareagens IV:

0.2 g Kaliumhexocyanoferrat (MERCK Nr. 4984)

100 ml 2n Salzsäure

5. Entwickeln der Substanzflecke

Nachdem die DC-Platte im sichtbaren und im UV-Licht betrachtet worden war, wurde an ihrem oberen Rand über der Fließmittelfront ein ungefähr 1 cm breiter Streifen des Silikagels abgekratzt. Darauf wurde die Platte mit der abgekratzten Zone nach unten in eine Kammer gestellt, deren Boden mit halbkonzentrierter Salzsäure bedeckt war. In diese Kammer wurde dann eine Spatelspitze Natriumnitrit gegeben, bis sich ausreichend nitrose Gase entwickelten. Die Platte wurde 2 min in der Kammer belassen und dann mit Kaltluft abgeblasen. War nichts mehr von den nitrosen Gasen zu riechen, so wurde die Platte mit Sprühreagent I angefärbt.

Bis auf das Diazepam zeigten alle Substanzen einen leuchtend-blau-violetten Fleck bei einem $R_f = 0.50$ oder $R_f = 0.35$ (Nitrazepam). Dabei war der Fleck des Nitrazepams mehr rötlich und der des Lorazepams mehr bläulich als die anderen.

Hatten die Platten vor dem Diazotieren 2-3 Tage gelegen, so erschien auch beim Diazepam sowie beim Medazepam bei $R_f = 0.69$ ein schwach-blau-violetter Fleck (teilweise Demethylierung am Aminstickstoff). Abb. 3 zeigt das sich ergebene Substanzfleckenmuster

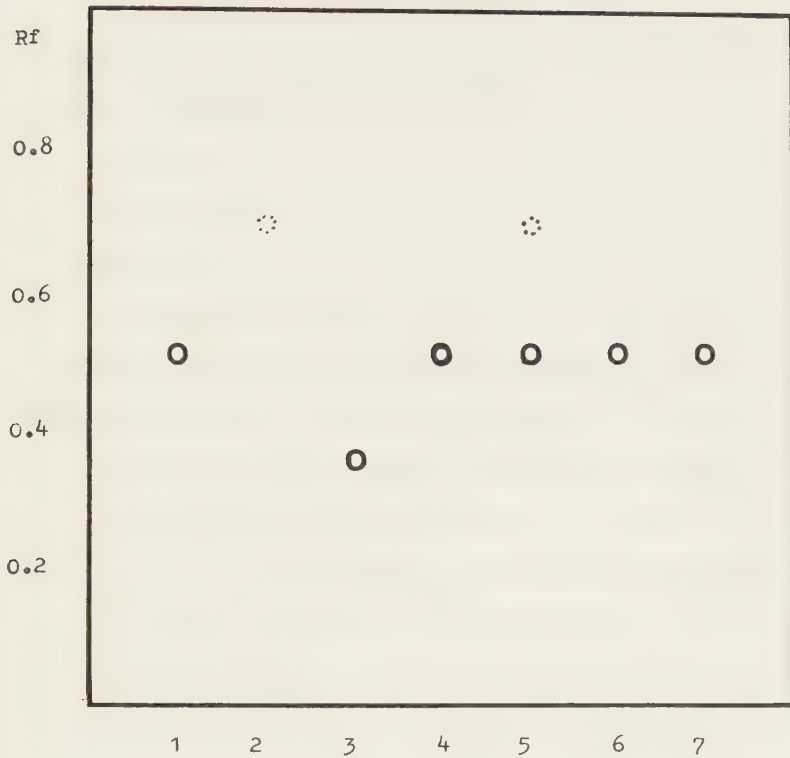


Abb. 10 Nach Diazotierung

1 = Chlordiazepoxyd

2 = Diazepam

3 = Nitrazepam

4 = Dikaliumchlorazepat

5 = Medazepam

6 = Oxazepam

7 = Lorazepam

Um das Verhalten der Benzodiazepinderivate und ihrer Metaboliten gegen Reduktionsmittel zu untersuchen, wurde der oben beschriebene Entwicklungsgang modifiziert:

Die DC-Platte wurde nach dem Chromatografieren mit dem Sprühreagens II (Titan (III)-chlorid) besprüht. Die noch feuchte Platte wurde dann nach 3 min in eine Kammer mit Bromdämpfen gestellt, um den Überschuß an Titan(III)-chlorid zu oxydieren. Nach weiteren 2 min wurde die DC-Platte herausgenommen, wie oben beschrieben diazotiert, und dann mit Sprühreagens I besprüht. Alle Substanzflecke nahmen dabei eine leuchtend-karminrote Farbe an. Diazepam und Nitrazepam zeigten nur je einen Substanzfleck bei $R_f = 0.69$ oder $R_f = 0.35$. Chlordiazepoxyd, Dikalium-Chlorazepat, Medazepam, Oxazepam und Lorazepam wiesen alle sowohl bei $R_f = 0.29$, als auch bei $R_f = 0.50$ einen Fleck auf. Außerdem hatte Dikalium-Chlorazepat noch bei $R_f = 0.40$ und Medazepam bei $R_f = 0.69$ einen weiteren Fleck. Diese Befunde sind in Abbildung 4 zusammengefaßt.

SISENWIENE et al. hatten beim Menschen einen Oxazepam-Metaboliten gefunden, der eine phenolische Hydroxylgruppe trägt. Da einige Benzodiazepine über Oxazepam abgebaut werden (s.o.), wurde versucht, diese Metaboliten chromatografisch zu erfassen, um so eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit zu haben. Dazu wurden die betreffenden Ursubstanzextrakte ohne Hydrolyse aufgearbeitet. Die fertigen DC-Platten wurden zuerst mit Sprühreagens III (2,4-Dinitrophenylhydrazin) und dann mit Sprühreagens IV (Kaliumhexacyanoferrat) besprüht. Es ließ sich jedoch damit

keine weitergehende Differenzierung erzielen. Offensichtlich stellen die Metaboliten mit phenoligen Hydroxylgruppen mengenmäßig einen zu geringen Anteil dar und lassen sich chromatografisch nicht erfassen.

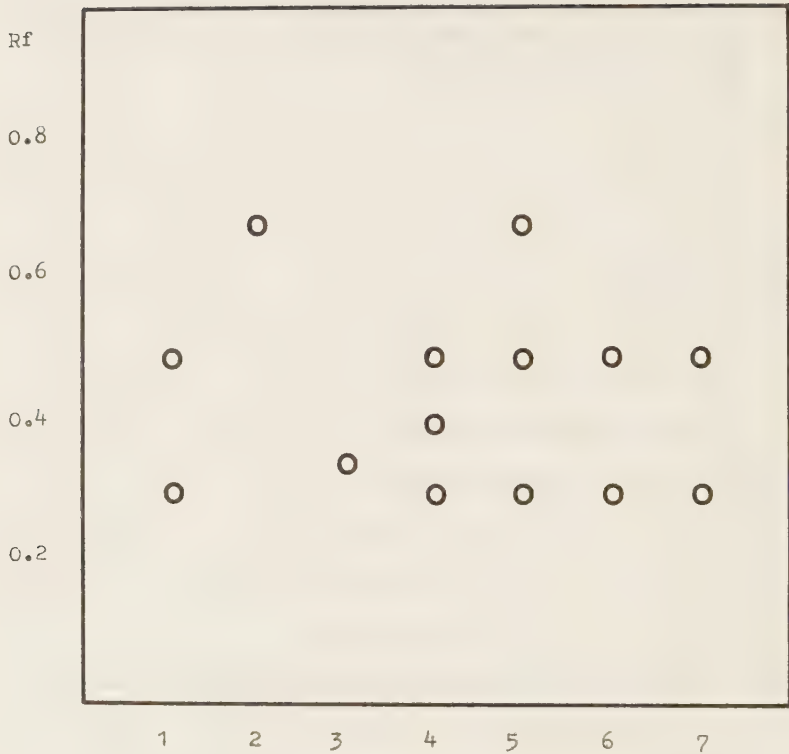


Abb. 11 Nach Reduktion mit Titan(III)-chlorid

- 1 = Chlordiazepoxyd
- 2 = Diazepam
- 3 = Nitrazepam
- 4 = Dikaliumchlorazepat
- 5 = Medazepam
- 6 = Oxazepam
- 7 = Lorazepam

III. Empfohlene Analysenmethodik

20 ml des zu untersuchenden Urins werden einmal mit 40 ml Äther ausgeschüttelt. In dieser Ätherfraktion löst sich schon ein großer Teil der Lebensmittelfarbstoffe und deren Metaboliten, jedoch nur sehr wenig von dem ursprünglichen Wirkstoff. Auf diese Weise können diese "Störsubstanzen", die die Auswertung des Dünnschichtchromatogramms nur unnötig erschweren, weitgehend entfernt werden.

Die verbleibende wässrige Phase wird in einen 50 ml-Kolben gegeben und 2.5 ml konz. Salzsäure zugesetzt. Das Gemisch wird dann unter Rückfluß 30 min bei 100° C hydrolysiert, danach im Eisbad abgekühlt und mit 10n Natronlauge auf pH 10 gebracht. Danach wird dreimal mit peroxidfreiem Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge werden mit geglühtem Natriumsulfat entwässert und auf dem Wasserbad durch Destillation vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in maximal 5 Tropfen Benzol aufgenommen, auf die Silikagel-DC-Platte aufgetragen und mit dem Gemisch Chloroform:n-Heptan:Äthanol = 10:10:1 als Fließmittel chromatografiert. Die fertige DC-Platte läßt man ungefähr 12 Stunden an der Luft liegen, betrachtet sie dann sowohl im sichtbaren, als auch unter dem UV-Licht und diazotiert dann in der Gasphase mit halbkonzentrierter Salzsäure und wenig Natriumnitrit. Die überschüssigen nitrosen Gase werden mit Kaltluft abgeblasen, und die Platte wird mit Sprühreagenz I (N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid) angefärbt.

Zur genaueren Unterscheidung kann man vor dem Diazotieren noch mit Titan(III)-chlorid reduzieren.

C. Zusammenfassung

Aufgabe der Untersuchung war, die Erarbeitung der optimalen Methodik zur Analyse von Benzodiazepin-Derivaten aus dem Urin, und zwar auf Grund ihrer im Urin nachzuweisenden Metaboliten. Die Extrakte des Sammelurins wurden im Dünnschichtchromatogramm differenziert und die optimalen Färbemittel und die Rf-Werte wurden festgelegt.

Gut voneinander unterscheiden lassen sich die Präparate Diazepam, Nitrazepam, Medazepam und Dikalium-Chlorazepat. Sie können auch von der Gruppe der Präparate Chlordiazepoxyd, Oxazepam und Lorazepam unterschieden werden, die untereinander nicht zu unterscheiden sind.

Können auch nicht immer die einzelnen Präparate bestimmt werden, so ist doch ein Ausschluß anderer Präparate möglich

D. Literatur

BEYER, K.: Die Biotransformation der Benzodiazepin-derivate. Dtsch. Apoth.-Ztg. 111, 40, 1971.

BEYER, K. und W. SADEE : Spectrophotometrische Bestimmung von 5-Phenyl-1, 4-benzodiazepinderivaten und über den Metabolismus des Nitrazepam. Arzneim.-Forsch. 19, 1929, 1969.

BRUNAUD, M., J. NAVARRO, J. SALLE und G. SION: Pharmacological, Toxicological and Teratological Studies on Dipotassium-7-chloro-3-carboxy-1, 3-dihydro-2, 2-dihydroxy-5-phenyl-2H-1, 4-benzodiazepin-chloroazepate (Dipotassium chloroazepate, 4306 CB), a New Tranquillizer. Arzneim.-Forsch. 20, 123, 1970.

DE SILVA, J., M SCHWARTZ, V. STEFANOVIC, J. KAPLAN und L. D'ARCONTE: Determination of Diazepam (Valium) in Blood by Gas Liquid Chromatography. Anal. Chem. 36, 2099, 1964.

GLUCKMANN, M.: Pharmacology of 7-Chloro-5-(o-chlorophenyl)-1, 3-dihydro-3-hydroxy-2H-1, 4-benzodiazepin-2-one (Lorazepam, Wy 4036). Arzneim.-Forsch. 21, 1049, 1971.

HOFMANN, K., J. MANACH und H. SÖGTOP: Dikalium-Chlorazepat. Klinische Berichte über ein neues Anxiolytikum. Arzneim.-Forsch. 20, 130, 1970.

JOMMI, G., P. MANITO and M. SILANOS: Metabolism of Diazepam in Rabbits. Arch. Biochem. Biophys. 108, 334, 1964.

KAMM, G. und R. BEIER: Nachweis von Chlordiazepoxyd und Diazepam in kleinen Blutmengen. Arzneim.-Forsch. 19, 213, 1969.

KNOWLES, J., W. COMER, and H. RUELIUS: Disposition of 7-Chloro-5-(o-chlorophenyl)-1, 3-dihydro-3-dihydroxy-2H-1, 4-benzodiazepin-2-one (Lorazepam) in Humans. Arzneim.-Forsch. 21, 1055, 1971.

KOECHLIN, B. and L. D'ARCONTE: Determination of Chlordiazepoxide (LIBRIUM) and of a Metabolite of Lactam Character in Plasma of Humans, Dogs, and Rats by a Specific Spectrofluorometric Micro Method. Anal. Biochem. 5, 1358, 1966.

KOECHLIN, B., M. SCHWARTZ, G. KROL and W. OBERMALLI: The Metabolic Fate of C¹⁴-labeled Chlordiazepoxide in Man, in the Dog, and in Rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 148, 399, 1965.

PRIBILLA, O.: Zum chemischen Nachweis von 1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1, 4-benzodiazepin-2-on. *Arzneim.-Forsch.* 15, 1148, 1965.

RANDALL, L., W. SCHALLEK, C. SCHECHTEL, R. BAGDON und J. RIEDER: Zur Pharmakologie von Mogadan, einem Schlafmittel mit neuartigem Wirkungsmechanismus. *Schweiz. med. Wschr.* 95, 10, 1965.

RIEDER, J.: Methoden zur Bestimmung von 1,3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1, 4-benzodiazepin-2-on und seinen Hauptmetaboliten in biologischen Proben und Ergebnisse von Versuchen über die Pharmakokinetik und den Metabolismus dieser Substanz bei Mensch und Ratte. *Arzneim.-Forsch.* 15, 1134, 1965.

RIEDER, J. und G. RENTSCH: Metabolismus und Pharmakokinetik des neuen Psychopharmakons 7-Chlor-2, 3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-1H-1, 4-benzodiazepin (Ro 5-4556) beim Menschen. *Arzneim.-Forsch.* 18, 1545, 1968.

RUELIUS, H., J. LEE, and H. ALBURN: Metabolism of Diazepam in Dogs: Transformation to Oxazepam. *Arch. Biochem. Biophys.* 111, 376, 1965.

SCHILLINGS, R., S. SHRADER and H. RUELIUS: Urinary Metabolites of 7-Chloro-5-(o-chlorophenyl)-1, 3-dihydro-3-hydroxy-2H-1, 4-benzodiazepin-2-one (Lorazepam) in Humans and Four Animal Species. *Arzneim.-Forsch.* 21, 1059, 1971.

SCHWARTZ, M., B. KOECHLIN, E. POSTMA, S. PALMER and G. KROL: Metabolism of Diazepam in Rat, Dog, and Man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 149, 423, 1965.

SCHWARTZ, M., and E. POSTMA: Metabolic N-Demethylation of Chlordiazepoxide. *J. Pharm. Sci.* 55, 1358, 1966.

SISENWINE, S., C. THIO, S. SHRADER and H. RUELIUS: The Biotransformation of Oxazepam (7-Chloro-1, 3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1, 4-benzodiazepin-2-one) in Man, Miniature Swine and Rat. *Arzneim.-Forsch.* 22, 682, 1972.

STEIN, L. and B. BERGER: Psychopharmacology of 7-Chloro-5-(o-chlorophenyl)-1, 3-dihydro-3-hydroxy-2H-1, 4-benzodiazepin-2-one (Lorazepam) in Squirrel Monkey and Rat. *Arzneim.-Forsch.* 21, 1073, 1971.

Für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, an seinem Institut die vorliegende Dissertation zu verfassen, bin ich Herrn Prof. Schleyer zu großem Dank verpflichtet.

Besonders danken möchte ich auch Herrn Dipl. Chem. Kamm für seine tatkräftige Unterstützung während meiner Arbeit in der toxikologischen Abteilung des Institutes.

Lebenslauf

Am 27. August 1945 kam ich, Detlef Queckenstedt, als Sohn des Arztes Dr. Hans Queckenstedt und seiner Ehefrau Gerda geb. Espig zur Welt.

Am 1.9.1951 wurde ich in Eisenach eingeschult und besuchte die Volksschule dort, sowie in Erfurt und Wuppertal. 1959 bestand ich die Aufnahmeprüfung am Aufbaugymnasium Sedanstraße in Wuppertal, wo ich auch am 1.3.1966 die Reifeprüfung ablegte. vom 4.4.1966 bis 30.9.1967 leistete ich meine Dienstzeit bei der Bundeswehr ab. Im Wintersemester 1967/68 begann ich mein Medizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg an der Lahn. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich im Herbst 1968, die ärztliche Vorprüfung im Frühjahr 1970. In allen Semestern war ich in Marburg immatrikuliert. Am 12. Februar 1973 begann ich mit dem Staatsexamen, das ich am 16. Juli 1973 abschloß.

Meine akademischen Lehrer

waren die Herren und Frauen Professoren und Dozenten:

Berendes, Bommer, Buchholz, Daume, Dimroth, Dölte,
Dombrowski, Engelhardt, Exner, Friedrich, Ganz, Graul,
hamelmann, Hensel, Hess, Heuser, Hildebrandt, Hort,
Jakob, Karlson, Keil, Koch, Koecke, Koransky, Korb,
Lehmann-Grube, Linneweh, Mann, Martini, Nesswetha,
Nöth, Nultsch, Petry, Pots, Rodeck, Rohen, Schleyer,
Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel, Siegert, Straub,
Stuke, Uhlarik, Voss, Walcher

